

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-46765

(43) 公開日 平成11年(1999) 2月23日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00
5/10		Z N A A
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02
G 0 1 N 33/68		C
		G 0 1 N 33/68
		C 1 2 N 5/00
		B

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平9-206939

(22) 出願日 平成9年(1997) 7月31日

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71) 出願人 592256162

小林 みどり

神奈川県藤沢市長後647-2 井上ハイツ
201号

(71) 出願人 597115358

加藤 誠志

神奈川県相模原市若松3-46-50

(72) 発明者 小林 みどり

神奈川県藤沢市長後647-2-201

(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膜蛋白質のトポロジー決定方法

(57) 【要約】

【課題】 膜蛋白質のトポロジーを簡便かつ確実に決定する方法を提供する。

【解決手段】 n 個 (n は2以上の整数) の膜貫通ドメインを有する膜蛋白質のトポロジーを決定する方法であって、膜蛋白質をコードする遺伝子から、開始コドンおよび第1番目から第 n 番目までの膜貫通ドメインを順次に連続して含む n 種類のDNA断片を調製し、これらのDNA断片のそれぞれのC末端にリポーター蛋白質をコードする遺伝子を融合させ、これらの融合遺伝子をそれぞれ動物細胞に導入して融合蛋白質を発現させ、各細胞におけるリポーター蛋白質の存在位置を指標として膜蛋白質のトポロジーを決定する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 n 個 (n は 2 以上の整数) の膜貫通ドメインを有する膜蛋白質のトポロジーを決定する方法であって、膜蛋白質をコードする遺伝子から、開始コドンおよび第 1 番目から第 n 番目までの膜貫通ドメインを順次に連続して含む n 種類の DNA 断片を調製し、これらの DNA 断片のそれぞれの C 末端にリポーター蛋白質をコードする遺伝子を融合させ、これらの融合遺伝子をそれぞれ動物細胞に導入して融合蛋白質を発現させ、各細胞におけるリポーター蛋白質の存在位置を指標として膜蛋白質のトポロジーを決定する方法。

【請求項 2】 リポーター蛋白質がプラスミノーゲンアクチベーターである請求項 1 の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】 この発明は、膜蛋白質のトポロジー決定方法に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、医薬品等を開発するために重要な膜蛋白質の構造情報としてのトポロジーを容易かつ確実に決定する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 膜蛋白質は、リセプター、イオンチャネル、トランスポーターなどとして、細胞膜を介する情報伝達や物質輸送において重要な機能を担っている。ある種の膜蛋白質は癌細胞で特異的に発現しているものがあり、これらは腫瘍抗原として各種診断薬や抗がん剤を開発するうえで有用である。また、遺伝子導入により特定の膜蛋白質を大量に発現させた細胞は、その膜蛋白質に対応するリガンドやそのアナログの探索およびそれらの生理活性測定に用いることができる。

【0003】 膜蛋白質は、その構造から大きく 2 種類に分けられる。一つは細胞膜表面に結合した表在性膜蛋白質であり、他方は細胞膜の脂質二重層に埋め込まれた内在性膜蛋白質である。内在性膜蛋白質の構造は、細胞外領域、細胞内領域および膜貫通ドメインから構成される。膜貫通ドメインは疎水性アミノ酸に富み、膜内においては α ヘリックスを形成すると考えられる。膜貫通ドメインを複数個有する蛋白質の場合、このドメインは、膜蛋白質が生合成される際、その C 末端側に続く新生ペプチド鎖の膜透過を開始させるシグナル配列、またはその透過を停止させるストップトランスファー配列として機能する。多くの場合、それぞれの機能を持ったドメインが交互に配置されており、このドメインを介して細胞外領域と細胞内領域が交互に並んでいる。このような膜蛋白質のトポロジー、すなわち膜蛋白質のどの部分が細胞外あるいは細胞内に配されるかは、個々の膜貫通ドメインがシグナル配列、ストップトランスファー配列のいずれとして機能するかにより決定される。

【0004】 膜蛋白質のトポロジーに関する情報は医薬品開発において重要である。たとえばリセプターに特異

的なリガンドのアナログあるいは腫瘍抗原に対する抗体を医薬として利用する場合、それらの結合部位となる細胞外領域の特定が必須である。また、変異膜蛋白質が原因となる疾患の治療薬を開発する場合、その変異部位が細胞のどの部分にあるかは、最も基礎的な情報となる。

【0005】 膜貫通ドメインの存在は、膜蛋白質の推定アミノ酸配列からある程度予測可能であり、これらの配列情報から、その膜蛋白質のトポロジーを類推することができる。これを実験的に検証する方法も考えられているが、従来行なわれているトポロジー解析法にはそれぞれ問題点がある。例えば、蛋白質を化学修飾する方法またはプロテアーゼに対する耐性を調べる方法の場合には、蛋白質の構造によっては化学修飾やプロテアーゼの分解を受けにくいことがあるとか、蛋白質の検出に抗体が必要とされるなどの問題点がある。

【0006】 膜蛋白質遺伝子とレポーター遺伝子との融合遺伝子が発現させ、レポーター遺伝子産物の局在からトポロジーを解析する方法も広く行なわれている。これらの方法においては、融合遺伝子は *大腸菌*、*インビトロ* 翻訳系、*アフリカツメガエル* 卵、動物由来培養細胞などで発現される。これらのうち *大腸菌* の発現系においては、レポーターとして *アルカリフォスファターゼ* が多用されている [Manoil, C. and Beckwith, J., *Science*, 233, 1403-1408, (1986) など]。この酵素の活性は、ペリプラズムに存在する場合には高く、細胞質内では低い。この局在性による酵素活性の違いを利用してトポロジーが判定される。しかし、このようにレポーター遺伝子産物の活性を直接検出することによりトポロジーを判定する方法は、*インビトロ* 翻訳系、*アフリカツメガエル* 卵や培養細胞の発現系においてはまだ報告されていない。これらの発現系においては、レポーターに対する抗体を用いることによって、間接的にレポーターを検出することが多い。最近、二つの膜貫通ドメイン間にエピトープタグを挿入した融合蛋白質を *ツメガエル* 卵で発現させ、このタグに対する蛍光標識抗体を用いて細胞の内側と外側から免疫染色を行ない、その染まり方の違いからタグが細胞のどちら側にあるかを判断するという方法が報告された [Shih, T. M., and Goldin, A. L., *J. Cell. Biol.* 136, 1037-1045, (1997)]。この方法はラジオアイソトープを必要としない点、膜貫通ドメイン間の相互作用に影響を与えない点で優れているが、融合遺伝子の構築や免疫染色の操作が煩雑であるなどの問題点がある。

【0007】 また、*ウロキナーゼ* をレポーターとして用い、分泌シグナルを検出する方法が報告されているが [Yokoyama-Kobayashi, M. et al., *Gene* 163:193-196 (1995)]、この方法を膜蛋白質のトポロジー決定に使用したという報告はない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 膜蛋白質のトポロジー

に関する情報は、医薬品開発等において極めて重要であるが、従来の方法では簡便かつ確実に膜蛋白質のトポロジーを決定することは困難であった。この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、簡便かつ確実に膜蛋白質のトポロジーを決定することのできる新しい方法を提供することを目的としている。

【0009】

【発明を解決するための手段】この発明の発明者らは、膜蛋白質の2個以上の膜貫通ドメインをコードするDNA断片とリポーター蛋白質遺伝子との融合遺伝子を動物細胞で発現させると、膜蛋白質のトポロジー依存的にリポーター蛋白質が膜表面に表出したり、細胞内に留まったりすることを見だし、この現象を利用することによって膜蛋白質のトポロジーを決定する方法を完成した。

【0010】すなわち、この発明は、 n 個（ n は2以上の整数）の膜貫通ドメインを有する膜蛋白質のトポロジーを決定する方法であって、膜蛋白質をコードする遺伝子から、開始コドンおよび第1番目から第 n 番目までの膜貫通ドメインを順次に連続して含む n 種類のDNA断片を調製し、これらのDNA断片のそれぞれのC末端にリポーター蛋白質をコードする遺伝子を融合させ、これらの融合遺伝子をそれぞれ動物細胞に導入して融合蛋白質を発現させ、各細胞におけるリポーター蛋白質の存在位置を指標として膜蛋白質のトポロジーを決定する方法を提供する。

【0011】また、この発明の方法においては、上記リポーター蛋白質がプラスミノゲンアクチベーターであることを好ましい態様としてもいる。

【0012】

【発明の実施の形態】この発明の方法は、基本的に、次の3つのステップからなっている。

1：トポロジーを決定すべき膜蛋白質をコードする遺伝子から調製したDNA断片とリポーター蛋白質をコードする遺伝子とを融合させて融合遺伝子を調製する。

【0013】2：調製した融合遺伝子を、トランスフェクション法を用いて動物細胞に導入する。

3：融合遺伝子を導入した細胞を培養し、融合遺伝子を発現させ、細胞膜表面上のリポーター蛋白質の有無を調べる。

各ステップについて以下に詳しく説明する。

ステップ1

Kyte & Doolittle法 [Kyte, J. & Doolittle, R.F., J. M. Biol. 157:105-132 (1982)] などを用いて、トポロジーを決定すべき膜蛋白質（以下、「ターゲット蛋白質」と記載することがある）の中における膜貫通ドメインの存在部位を推定する。次に、このターゲット蛋白質遺伝子から、開始コドンを含み、かつその下流に n 個の膜貫通ドメインを順次1個づつ含む n 種類のDNA断片を調製する。このようなDNA断片の調製は、例えば、適当な制限酵素による消化等によって行うことができ

る。また、膜貫通ドメイン間に適当な制限酵素部位が無い場合には、目的とする領域の前後の配列に相補的なオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとしてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法により目的とするDNA断片を調製することもできる。なお、DNA断片は、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAなどいかなる形態のDNAからも調製することができる。

【0014】次いで、得られたDNA断片とレポーター蛋白質遺伝子とを連結し、ターゲット蛋白質のN末端領域とリポーター蛋白質との融合蛋白質をコードする融合遺伝子を調製する。このような融合遺伝子の調製は、例えば、DNA断片をリポーター蛋白質の発現ベクターに挿入し、融合蛋白質発現ベクターを作成することによって行うことができる。

【0015】リポーター蛋白質としては、そのN末端に膜貫通ドメインを付加してやれば細胞表面に輸送され、かつ輸送されて細胞表面に表出したものと、細胞内に留まったものの差異を容易に検出できるものが望ましい。例えば、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター、組織プラスミノゲンアクチベーター、血液凝固因子などの酵素類を例示することができる。また、リポーター蛋白質が本来分泌蛋白質である場合には、これらの蛋白質由来の分泌シグナル配列ペプチドを除去したものをを用いることが好ましい。

ステップ2

ステップ1で作成した融合遺伝子を動物細胞に導入するには、例えば、融合蛋白質発現ベクターで大腸菌を形質転換したのち、単一コロニー化し、各々から調製したプラスミド、一本鎖DNA、あるいは一本鎖ファージ等を用いて動物細胞のトランスフェクションを行なう。

【0016】発現ベクターを動物細胞に導入するには、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、リボソーム法、エレクトロポレーション法等を用いることができる（例えば、実験医学別冊「遺伝子工学ハンドブック」、羊土社、1991年を参照）。あるいは、一本鎖ファージを調製した後、これを用いてトランスフェクションを行なえば、より容易に遺伝子を動物細胞に導入することができる [Yokoyama-Kobayashi and Kato, Biochem. Biophys. Res. Commun. 192:935-939 (1993)]。

【0017】動物細胞としては、内在性のリポーター蛋白質を発現しておらず、ベクターに組み込まれた複製オリジンやプロモーターが働くものであれば、どのような細胞であってもよい。なお、実施例に示したようなSV40の複製オリジンやプロモーターを使用する場合には、T抗原を発現しているCOS細胞が適している。

ステップ3

発現ベクター等として融合遺伝子を導入した動物細胞を適当な条件下で培養した後、培養液を除去し、細胞を十分洗浄した後、リポーター蛋白質が膜表面に留まっているかどうかを検出する。この検出には、使用したリポ

ター蛋白質に応じた検出法を用いる。酵素の場合には、対応する酵素活性検出法を用いる。ウロキナーゼをリポーター蛋白質とした場合には、人工基質ペプチドを用いる方法やフィブリンプレート法等を用いることができる。例えば、フィブリンを含む寒天シートを動物細胞の上に直接接触させることによって、細胞表面上に存在するウロキナーゼの活性を測定することができる。また、細胞を破碎した後、その破碎液の活性を測定してもよい。ウロキナーゼが細胞内に留まっているときは、これらのアッセイ法ではウロキナーゼ活性が検出されない。

【0018】以上の方法により、N末端から開始コドンおよび膜貫通ドメインを順次有する各DNA断片とリポーター遺伝子との融合遺伝子を細胞で発現させた場合に、融合蛋白質のC末端に存在するウロキナーゼが、膜表面に出ているかどうかを判定することができる。したがって、これらの結果を総合的に判断することにより、ターゲット蛋白質の膜貫通ドメインが細胞膜の中でどのように配向しているかを決定することができ、最終的に膜蛋白質のトポロジーを決定することができる。

【0019】

【実施例】次に実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明はこれらの例に限定されるものではない。なお、DNAの組換えに関する基本的な操作および酵素反応は、文献("Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)に従った。制限酵素および各種修飾酵素は特に記載の無い場合は宝酒造社製のものを用いた。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書に従った。

参考例1：4個の膜貫通ドメインを有する膜蛋白質遺伝子HP00966のクローニング

ヒト骨肉種細胞株Saos-2細胞cDNAライブラリーから選択したcDNAクローンの大規模塩基配列決定の結果、膜蛋白質遺伝子のクローンHP00966を得た。このクローンは、配列番号1に示した塩基配列からなり、155bpの5'非翻訳領域、762bpのオープンリーディングフレーム、805bpの3'非翻訳領域からなる構造を有していた。オープンリーディングフレームは253アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしており、この配列を用いてプロテインデータベースを検索したところ、全領域にわたってヒトCD63抗原[Metzelaar, M. J. et al., J. Bio. Chem. 266: 3239-3245 (1991)]のアミノ酸配列と32.5%の相同性を有していた。図1には、Kyte & Doolittle法[Kyte, J. & Doolittle, R. F., J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982)]で求めたこの蛋白質の疎水性プロフィールを示す。4箇所に膜貫通ドメインと思われる疎水性の高い領域が見られる。このパターンは、他のTM4スーパーファミリーに共通してみられる特徴である。

実施例1：ウロキナーゼ融合蛋白質の発現ベクターの構

築

図2に各々の構成を模式的に示した4種類の融合遺伝子による組換えベクター以下の手順で作成した。

(1) pSSD1 ベクターフラグメントの調製

1 μ g のpSSD1 プラスミドを制限酵素SnaBI 10ユニット、制限酵素EcoRV15 ユニットにより消化後、大腸菌由来アルカリフォスファターゼ0.6 ユニットにより末端のリン酸基を除去した。このものを0.7%アガロースゲル電気泳動にかけ、約4,500 塩基対のフラグメントを単離した。

(2) HP00966 の第1膜貫通ドメインの翻訳領域を含むpSSD1-966.1 の構築

2 μ g のHP00966 クローンを制限酵素SnaBI 10ユニット、制限酵素AfaI 10ユニットにより消化した後、1.5%アガロースゲル電気泳動にかけ、0.3kb のフラグメントを単離した。このフラグメント約20ngと上記(1)で得られたベクターフラグメント約10ngを混和し、宝酒造製DNAライゲーションキットを用いて連結させた。この反応物を用いて大腸菌JM109 の形質転換を行ない、得られたアンピシリン耐性コロニーから6株を選び、2mlのLB培地にて37℃、一夜培養した。これらの菌体から抽出したプラスミド約0.5 μ g を2ユニットの制限酵素NcoIにより消化後、1.0%アガロースゲル電気泳動にかけた。この泳動パターンから、HP00966 由来cDNAフラグメントが正方向に挿入されているクローンを選出し、pSSD1-966.1 とした。

(3) HP00966 の第1～第2膜貫通ドメインの翻訳領域を含むpSSD1-966.2 の構築

HP00966 クローンを鋳型とし、合成DNAプライマー5'-GCGAGATCTGTATTTAATACGACTCACTATAGGG-3' および5'-CGGATATCGACTTCCCGGATTGTGGC-3'、パーキンエルマー社製Ampli taq 5ユニットを用いてPCRを行ない、反応産物をエタノール沈殿により精製した。この産物を制限酵素SnaBI 10ユニット、制限酵素EcoRV15ユニットにより消化後、1.5%アガロースゲル電気泳動にかけ、約0.4kb のフラグメントを単離した。このフラグメント約20ngと上記(1)で得られたベクターフラグメント約10ngを混和し、宝酒造製DNAライゲーションキットを用いて連結させた。この反応物を用いて大腸菌JM109 の形質転換を行ない、得られたアンピシリン耐性コロニーから6株を選び、2mlのLB培地にて37℃、一夜培養した。これらの菌体から抽出したプラスミド約0.5 μ g を2ユニットの制限酵素NcoIにより消化後、1.0%アガロースゲル電気泳動にかけた。この泳動パターンから、HP00966 由来cDNAフラグメントが正方向に挿入されているクローンを選出し、pSSD1-966.2 とした。

(4) HP00966 の第1～第3膜貫通ドメインのコード領域を含むpSSD1-966.3の構築

2 μ g のHP00966 クローンを制限酵素SnaBI 10ユニット、制限酵素EcoT22 10 ユニットにより消化した後、宝

酒造製DNAブラントニングキットにより末端を平滑化した。このものを1.5%アガロースゲル電気泳動にかけ、約0.8kbのフラグメントを単離した。このフラグメント約20ngと上記(1)で得られたベクターフラグメント約10ngを混和し、宝酒造製DNAライゲーションキットを用いて連結させた。この反応物を用いて大腸菌JM109の形質転換を行ない、得られたアンピシリン耐性コロニーから6株を選び、2mlのLB培地にて37℃、一夜培養した。これらの菌体から抽出したプラスミド約0.5 µgを2ユニットの制限酵素NcoIにより消化後、1.0%アガロースゲル電気泳動にかけた。この泳動パターンから、HP00966 由来cDNAフラグメントが正方向に挿入されているクローンを選出し、pSSD1-966.3とした。

(5) HP00966 の第1～第4膜貫通ドメインのコード領域を含むpSSD1-966.4の構築

2 µgのHP00966 クローンを制限酵素SnaBI 10ユニット、制限酵素SacI 15ユニットにより消化した後、宝酒造製DNAブラントニングキットにより末端を平滑化した。このものを1.5%アガロースゲル電気泳動にかけ、約0.9kbのフラグメントを単離した。このフラグメント約20ngと上記(1)で得られたベクターフラグメント約10ngを混和し、宝酒造製DNAライゲーションキットを用いて連結させた。この反応物を用いて大腸菌JM109の形質転換を行ない、得られたアンピシリン耐性コロニーから6株を選び、2mlのLB培地にて37℃、一夜培養した。これらの菌体から抽出したプラスミド約0.5 µgを2ユニットの制限酵素NcoIにより消化後、1.0%アガロースゲル電気泳動にかけた。この泳動パターンから、HP00966 由来cDNAフラグメントが正方向に挿入されているクローンを選出し、pSSD1-966.4とした。

実施例2：各種融合遺伝子の発現およびウロキナーゼ活性の検出

(1) pSSD1 各種誘導体の発現

文献[Yokoyam-Kobayashi, M. et al., Gene 163:193-196 (1995)]記載の方法に従って約100ngのpSSD1-966.1、pSSD1-966.2、pSSD1-966.3、pSSD1-966.4の一本鎖DNAを含むファージ粒子、コントロールとして同量のpSSD1の一本鎖DNAを含むファージ粒子を、それぞれ7.5 µgのリボポリアミン(TRANSFECTAM)を用いてサル腎臓由来培養細胞株COS7(10⁶個)に導入した。これらの細胞を37℃、5%CO₂の条件下で5日間培養した。

(2) 培地中のウロキナーゼ活性の検出

文献[Yokoyam-Kobayashi, M. et al., Gene 163:193-196 (1995)]記載の方法に従って調製したフィブリンプレートに上記(1)の各細胞の培養液10 µlをのせ、37℃にて一夜インキュベートした。この結果、いずれの細胞の培地からもウロキナーゼ活性は検出されなかった。

(3) 細胞表面のウロキナーゼ活性の検出

50mMリン酸緩衝液(pH7.4)を用いて、ウシ由来フィブ

リノーゲンの2%溶液および0.5%アガロース溶液を調製し、各液1mlに1M塩化カルシウム2 µl、トロンビン2ユニットを加え、直径3.5cmのプレートに流し込み、37℃にて1時間重合させた。このプレートから重合したフィブリンを剥がし、薄膜状のフィブリン(フィブリンシート)を得た。次いで、上記(1)の培養細胞から培地を除去し、リン酸緩衝液を含む生理食塩水(PBS)により細胞表面を洗浄した。この細胞の表面に密着するようにフィブリンシートをのせ、37℃、一夜インキュベートした。この結果、pSSD1、pSSD1-966.2、pSSD1-966.4を発現させた細胞についてはフィブリンシートに変化は見られなかった。一方、pSSD1-966.1、pSSD1-966.3を発現させた細胞ではフィブリンシートに溶解斑が観察された(図3)。以上の結果から、HP00966によってコードされている膜蛋白質は、図4に示されるように、N末端、第1膜貫通ドメインと第3膜貫通ドメインの間の部分、およびC末端が細胞質側にあり、第1膜貫通ドメインと第2膜貫通ドメインの間の部分並びに第3膜貫通ドメインと第4膜貫通ドメインの間の部分が、細胞外に出ている構造をとっていることがわかった。なお、この構造は、TM4スーパーファミリーの膜蛋白質のトポロジーとして予想されていたものと一致した。

(4) 超音波破碎した細胞からのウロキナーゼ活性の検出

上記(1)の培養細胞から培地を除去し、PBSにより細胞表面を洗浄した後、セルスクレイパー(ファルコン社製)を用いて細胞を培養ディッシュから剥がした。この細胞を0.2mlのPBSに懸濁し、超音波細胞破碎装置バイオラプター(コスモバイオ社製)により出力H、レベル4、15秒間、10回の条件において超音波処理を行った。処理後の懸濁液10 µlをフィブリンプレートにのせ、37℃にて一夜インキュベートした。この結果、pSSD1、pSSD1-966.2、pSSD1-966.4を発現させた細胞についてはウロキナーゼ活性は検出されなかった。一方、pSSD1-966.1、pSSD1-966.3を発現させた細胞ではウロキナーゼ活性が検出された。以上の結果は、膜表面の活性を直接測定した上記(3)の結果と一致した。

【0020】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明の方法により、膜蛋白質のトポロジーを簡便かつ確実に決定することが可能となる。決定された膜蛋白質の構造は、その膜蛋白質を医薬品として用いる場合や、医薬品のターゲットとして用いる場合に、有用な情報を提供する。

【0021】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1722

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

生物名：ホモ=サビエンス

細胞の種類：骨肉腫

セルライン：Saos-2

クローン名：HP00966

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：156..917

特徴を決定した方法：E

配列

```

ACTTGTGGG GTCGGGGCTG CGCGACGGCG CAGGGGCTGC GGGGAGCGCC GCGCAGGCCG 60
TGCAGTTCCT AGCGAGGAGG CGCCGCCGCC ATTGCCGCTC TCTCGGTGAG CGCAGCCCCG 120
CTCTCCGGGC CGGGCCTTCG CGGGCCACCG GCGCC ATG GGC CAG TGC GGC ATC 173
Met Gly Gln Cys Gly Ile
1 5
ACC TCC TCC AAG ACC GTG CTG GTC TTT CTC AAC CTC ATC TTC TGG GGG 221
Thr Ser Ser Lys Thr Val Leu Val Phe Leu Asn Leu Ile Phe Trp Gly
10 15 20
GCA GCT GGC ATT TTA TGC TAT GTG GGA GCC TAT GTC TTC ATC ACT TAT 269
Ala Ala Gly Ile Leu Cys Tyr Val Gly Ala Tyr Val Phe Ile Thr Tyr
25 30 35
GAT GAC TAT GAC CAC TTC TTT GAA GAT GTG TAC ACG CTC ATC CCT GCT 317
Asp Asp Tyr Asp His Phe Phe Glu Asp Val Tyr Thr Leu Ile Pro Ala
40 45 50
GTA GTG ATC ATA GCT GTA GGA GCC CTG CTT TTC ATC ATT GGG CTA ATT 365
Val Val Ile Ile Ala Val Gly Ala Leu Leu Phe Ile Ile Gly Leu Ile
55 60 65 70
GGC TGC TGT GCC ACA ATC CGG GAA AGT CGC TGT GGA CTT GCC ACG TTT 413
Gly Cys Cys Ala Thr Ile Arg Glu Ser Arg Cys Gly Leu Ala Thr Phe
75 80 85
GTC ATC ATC CTG CTC TTG GTT TTT GTC ACA GAA GTT GTT GTA GTG GTT 461
Val Ile Ile Leu Leu Leu Val Phe Val Thr Glu Val Val Val Val Val
90 95 100
TTG GGA TAT GTT TAC AGA GCA AAG GTG GAA AAT GAG GTT GAT CGC AGC 509
Leu Gly Tyr Val Tyr Arg Ala Lys Val Glu Asn Glu Val Asp Arg Ser
105 110 115
ATT CAG AAA GTG TAT AAG ACC TAC AAT GGA ACC AAC CCT GAT GCT GCT 557
Ile Gln Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Asn Gly Thr Asn Pro Asp Ala Ala
120 125 130
AGC CGG GCT ATT GAT TAT GTA CAG AGA CAG CTG CAT TGT TGT GGA ATT 605
Ser Arg Ala Ile Asp Tyr Val Gln Arg Gln Leu His Cys Cys Gly Ile
135 140 145 150
CAC AAC TAC TCA GAC TGG GAA AAT ACA GAT TGG TTC AAA GAA ACC AAA 653
His Asn Tyr Ser Asp Trp Glu Asn Thr Asp Trp Phe Lys Glu Thr Lys
155 160 165
AAC CAG AGT GTC CCT CTT AGC TGC TGC AGA GAG ACT GCC AGC AAT TGT 701
Asn Gln Ser Val Pro Leu Ser Cys Cys Arg Glu Thr Ala Ser Asn Cys
170 175 180
AAT GGC AGC CTG GCC CAC CCT TCC GAC CTC TAT GCT GAG GGG TGT GAG 749
Asn Gly Ser Leu Ala His Pro Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Gly Cys Glu
185 190 195
GCT CTA GTA GTG AAG AAG CTA CAA GAA ATC ATG ATG CAT GTG ATC TGG 797
Ala Leu Val Val Lys Lys Leu Gln Glu Ile Met Met His Val Ile Trp

```

```

      200              205              210
GCC GCA CTG GCA TTT GCA GCT ATT CAG CTG CTG GGC ATG CTG TGT GCT      845
Ala Ala Leu Ala Phe Ala Ala Ile Gln Leu Leu Gly Met Leu Cys Ala
      215              220              225              230
TGC ATC GTG TTG TGC AGA AGG AGT AGA GAT CCT GCT TAC GAG CTC CTC      893
Cys Ile Val Leu Cys Arg Arg Ser Arg Asp Pro Ala Tyr Glu Leu Leu
      235              240              245
ATC ACT GGC GGA ACC TAT GCA TAGTTGACAA CTCAAGCCTG AGCTTTTGG      944
Ile Thr Gly Gly Thr Tyr Ala
      250              253
TCTTGTCTCT ATTTGGAAGG TGAATTGAGC AGGTCTGCTG CTGTTGGCCT CTGGAGTTCA 1004
TTTAGTTAAA GCACATGTAC ACTGGTGTG GACAGAGCAG CTTGGCTTTT CATGTGCCCA 1064
CCTACTTACC TACTACCTGC GACTTTCTTT TTCCTTGTTC TAGCTGACTC TTCATGCCCC 1124
TAAGATTTTA AGTACGATGG TGAACGTTCT AATTTCAGAA CCAATTGCGA GTCATGTAGT 1184
GTGGTAGAAT TAAAGGAGGA CACGAGCCTG CTTCTGTTAC CTCCAAGTGG TAACAGGACT 1244
GATGCCGAAA TGTACCAGG TCCTTTCAGT CTTACAGTG GAGAACTCTT GGCCAAAGGT 1304
TTTTGCGGGG AGGAGGAGGA AACCAGCTTT CTGGTTAAGG TTAACACCAG ATGGTGCCCC 1364
TCATTGGTGT CCTTTTAAAA AATATTTACT GTAGTCCAAT AAGATAGCAG CTGTACAAAA 1424
TGACTAAAAA AGATTGTAGG ATCATATGGC GTATATCTTG GTTCATCTTC AAAATCAGAG 1484
ACTGAGCTTT GAAACTAGTG GTTTTAAATC AAAGTTGGCT TTATAGGAGG AGTATAATGT 1544
ATGCACTACT GTTTTAAAG AATTAGTGTG AGTGTGTTT TGTATGAATG AGCCCATTC 1604
TGGTAAGTCT TAAGCTTGTG GAAAATAATG TACCATGTA GACTAGCAAA ATAGTATGTA 1664
GATGTGATCT CAGTTGTAAA TAGAAAAATC TAATCAATA AACTCTGTAT CAGCCCCC 1722

```

【図面の簡単な説明】

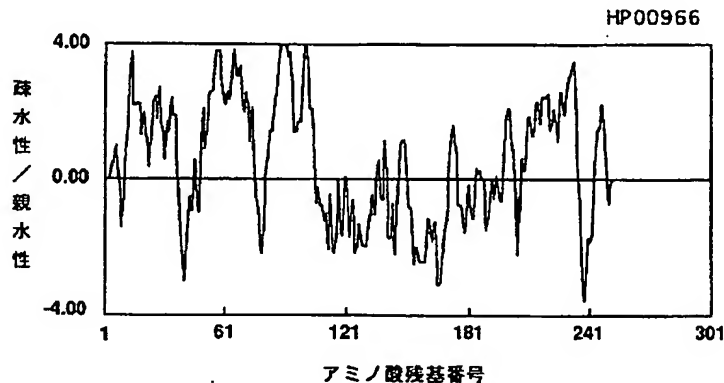
【図 1】膜蛋白質遺伝子のクローンH P 00966 のアミノ酸配列における疎水性／親水性プロフィールを示すグラフ図である。

【図 2】膜蛋白質H P 00966 とウロキナーゼの融合遺伝子の構成を表す模式図である。

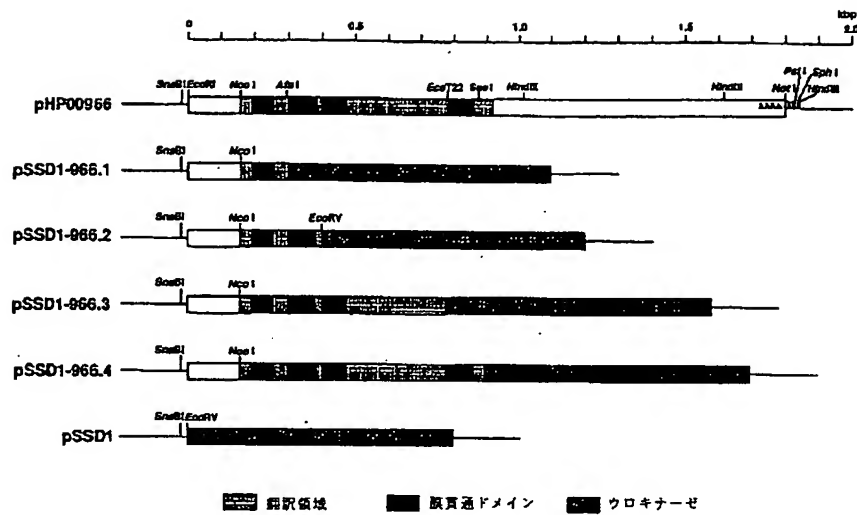
【図 3】細胞表面のウロキナーゼ活性を示す図面に代わる写真であり、各細胞は、上段左からpSSD1、pSSD1-9661、pSSD1-9662、下段左からpSSD1-10085、pSSD1-9663、pSSD1-9664による形質転換体である。

【図 4】この発明の方法によって決定された膜蛋白質H P 00966 のトポロジーを示す模式図である。

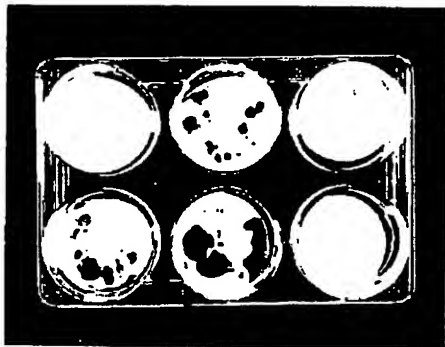
【図 1】



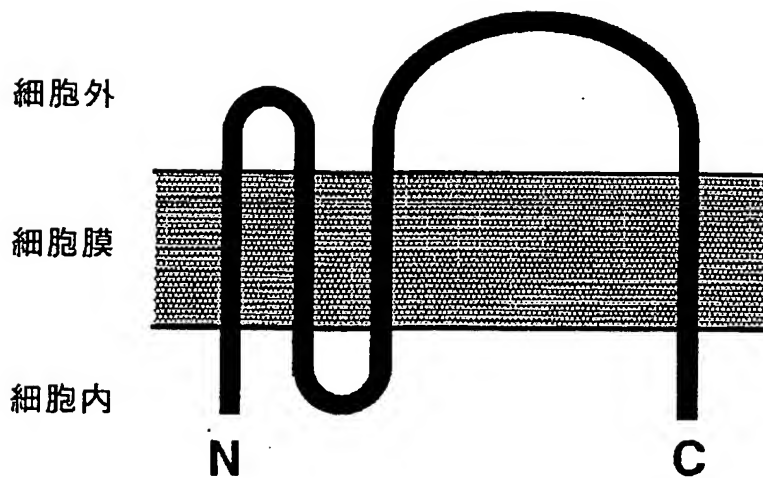
【図 2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(72)発明者 加藤 誠志
神奈川県相模原市若松 3-46-50